

Aus dem Institut für Klinische Chemie an den
Universitätskliniken der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor : Prof. Dr. med. L. Róka
und dem BIOTEST-Seruminstitut Frankfurt am Main

β -PROPIOLAKTONHYDROLYSE IN WASSER UND SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Gisela Rossow
aus Straßburg

1969

Aus dem Institut für Klinische Chemie an den
Universitätskliniken der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor : Prof. Dr. med. L. Róka

und dem BIOTEST-Seruminstitut Frankfurt am Main

β -PROPIOLAKTONHYDROLYSE IN WASSER UND SERUM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Gisela Rossow

aus Straßburg

1969

Dekan : Professor Dr. med. Rettig

Referent : Professor Dr. med. L. Róka

Korreferent : Professor Dr. H.A. Kühn

Tag der mündlichen Prüfung : 22. Oktober 1969

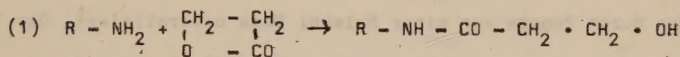


I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

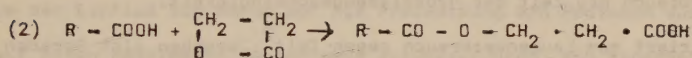
	Seite
EINLEITUNG	1
I. Teil: Hydrolyse in Wasser	3
1. Abhängigkeit vom pH	3
2. Abhängigkeit von der BPL-Konzentration	4
3. Abhängigkeit von der Temperatur	5
II. Teil: BPL-Hydrolyse in frischem Humanserum	7
1. Abhängigkeit vom pH	7
2. Abhängigkeit von der Temperatur	8
3. Abhängigkeit von der BPL-Konzentration	9
4. Abhängigkeit von der Serumkonzentration	10
5. pH Stabilität der hydrolysierenden Substanz	11
6. Lagerungsstabilität der hydrolysierenden Substanz	12
7. Anreicherung	12
III. Teil: Konkurrenz zwischen BPL-Hydrolyse und Azylierung	13
IV. Teil: Inaktivierung des Enzyms durch BPL	16
V. Teil: Zur Kinetik der BPL-Hydrolyse	18
VI. Teil: Zur Biologie des Enzyms	22
1. Vorkommen bei verschiedenen Spezies	22
2. Vorkommen in verschiedenen Organen	22
3. Beeinflussung der Enzymaktivität in vivo	23
4. Individuelle Verteilung der Enzymaktivität	24
VII. Teil: Substratspezifität	25
1. Konkurrenz BPL - Glucuronsäurelacton	26
DISKUSSION	29
ZUSAMMENFASSUNG	32
LITERATURVERZEICHNIS	

EINLEITUNG

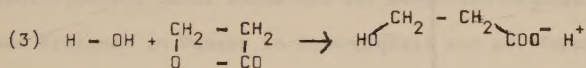
β Propiolakton wird ähnlich wie Äthylenoxyd zur Desinfektion verwendet. Die bakterizide und virizide Eigenschaft von β PL⁺ beruht offenbar auf der azylierenden Wirkung, wobei Aminogruppen von Proteinen durch den β -Hydroxy-Propionsäurerest substituiert werden:



Daneben muß auch mit Alkylierung gerechnet werden:



In wässrigem Milieu wird der nicht azylierende Anteil zu β -Hydroxy-Propionsäure hydrolysiert.



Auffallend ist, daß die β -PL-Hydrolyse im Serum schneller erfolgt als in Wasser (Abb. 1).

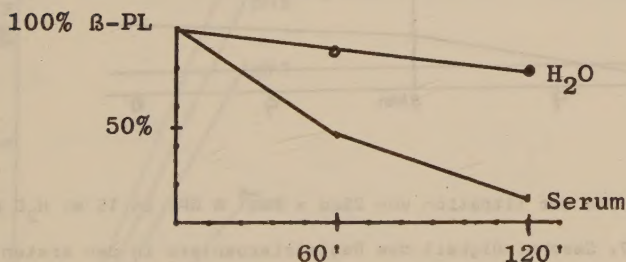


Abb. 1: Hydrolyse von $4000 \cdot 10^{-6}$ M β PL in 15 ml H_2O (5 ml Serum) bei $20^\circ C$, pH 7, Gesamtvolumen 15 ml

⁺ β PL = beta-Propiolakton

Im folgenden soll untersucht werden, worauf diese unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit beruht.

Methode:

Bei der Hydrolyse von BPL tritt pro Molekül ein Proton auf (Formel 3). Die Hydrolyse läßt sich daher am Auftreten von Protonen verfolgen. Arbeitet man mit einem pHStat¹, so wird jedes auftretende Proton durch Zugabe von einer Molekel Base neutralisiert. Der Laugenverbrauch entspricht dem hydrolysierten Anteil BPL, der Basenverbrauch pro Zeit der Hydrolysegeschwindigkeit.

Registriert man Laugenverbrauch gegen Zeit², ergeben sich Geraden wie in Abbildung 2.

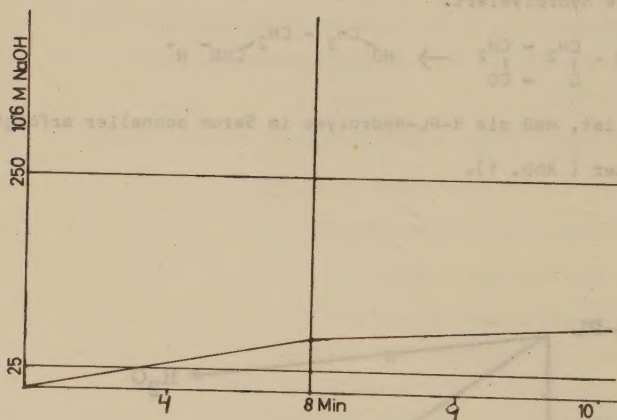


Abb. 2:

Originalkurve der Titration von 2500×10^{-6} M BPL in 15 ml H_2O bei $20^\circ C$, pH 7. Geschwindigkeit des Registrierpapiers in den ersten 8 Minuten: 7 mm/Min, von der 8. - 10. Min 28 mm/Min. Die Hydrolysegeschwindigkeit errechnet sich folgendermaßen: In 8 Min werden $2,5 \times 25 \times 10^{-6}$ M verbraucht, d.h. in einer Minute 8×10^{-6} M.

¹ Radiometer Kopenhagen

² Titrigraph Radiometer Kopenhagen

Die aufgeführte Originalkurve registriert den Laugenverbrauch. Sinkt die Hydrolysegeschwindigkeit im Verlauf der Registrierung ab, dann reicht die verbliebene BPL-Konzentration nicht mehr für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit H_2O aus oder es nehmen Aktivatoren ab oder Inhibitoren treten auf. Bei unseren Versuchen haben wir in der Regel die Anfangsgeschwindigkeit gemessen.

I. Teil: Hydrolyse in Wasser

Um den Einfluß von Serum auf die Freisetzung von Protonen aus BPL auf einen bestimmten Mechanismus zurückzuführen, muß zunächst geprüft werden, wie bekannte Faktoren die Freisetzung von Protonen beeinflussen. Daher wurde mit der genannten Methode die Freisetzung von Protonen in Wasser in Abhängigkeit von pH, Temperatur, BPL-Konzentration und zugesetzten Stoffen untersucht.

Wir erhielten folgende Ergebnisse:

1. Abhängigkeit vom pH

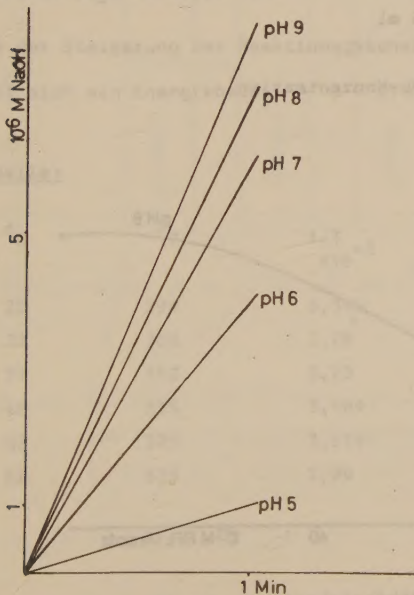


Abb. 3: Hydrolyse von 2000×10^{-6} M BPL in 15 ml H_2O bei $20^\circ C$.
Gesamtvolumen 15,125 ml

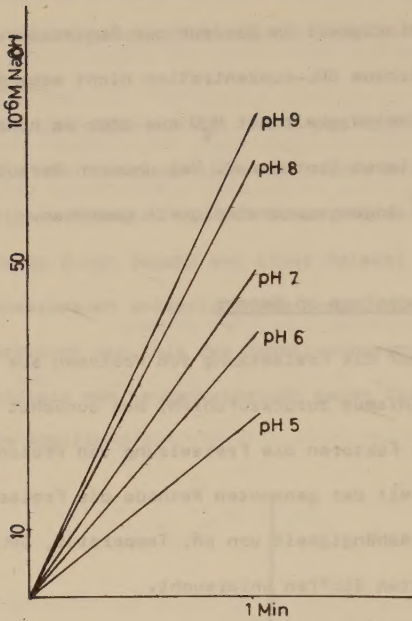


Abb. 4: Hydrolyse von $20\ 000 \times 10^{-6}$ M BPL in 15 ml H_2O .
Gesamtvolumen 16,5 ml

2. Abhängigkeit von der BPL-Konzentration

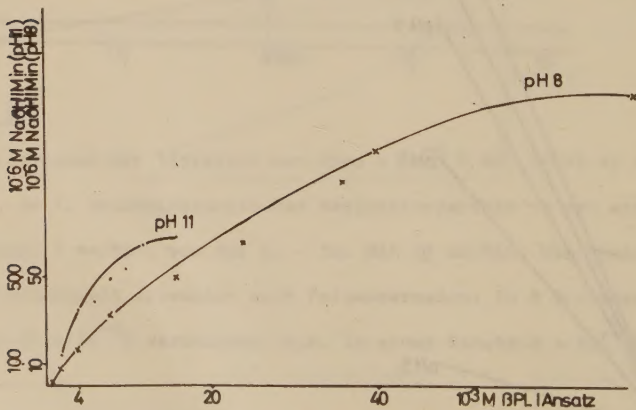


Abb. 5: BPL-Hydrolyse in Abhängigkeit von der BPL-Konzentration
bei $20^\circ C$ und zwei verschiedenen pH-Werten

3. Abhängigkeit von der Temperatur

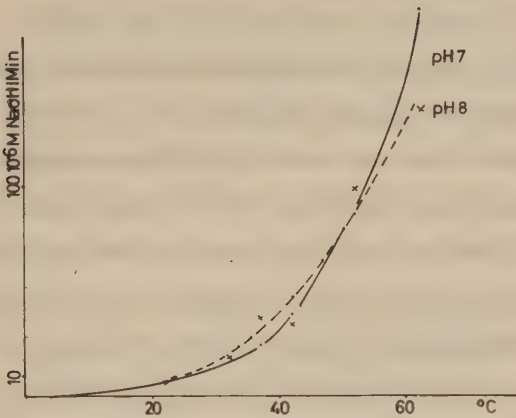


Abb. 6: BPL Spontanhydrolyse in Abhängigkeit von der Temperatur.
 $2000 \times 10^{-6} \text{ M}$ BPL bei 20°C . Gesamtvolumen $10,125 \text{ ml}$

Die Hydrolysegeschwindigkeit steigt mit zunehmendem pH stark an, ebenso mit zunehmender Temperatur. Die Abhängigkeit vom pH deutet auf eine Basenkatalyse hin.

Aus der Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur läßt sich ein Energiebedarf $\Delta G = 6750 \text{ cal/Mol}$ errechnen.

Tabelle:

$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{T}$	$1/T - 3$ $\times 10^{-3}$	v (pH 8) 10^{-6} M/min	$\log v$
22	295	3,395	7	0,8445
32	305	3,28	19	1,279
37	312	3,23	38	1,31
42	315	3,169	35	1,544
52	325	3,079	100	2,0
62	335	2,99	138	2,14

Die Hydrolysegeschwindigkeit steigt mit zunehmender BPL-Konzentration stark an, strebt aber einem Endwert zu. Bei rascher Hydrolyse (pH 11, 20°C) liegt die Sättigungskonzentration bei etwa 16×10^{-3} M, während bei langsamer Hydrolyse (pH 8, 20°C) die Sättigungskonzentration erst bei etwa 50×10^{-3} M gefunden wurde. Bei Sättigungskonzentration werden bei 20°C in einer Minute 4% (bei pH 11) bzw. 0,28% (bei pH 8) des vorbelegten BPL hydrolysiert. In der geprüften Konzentration zeigten Heparin (2%) als Polyanion, Protamin (2%) als Polykation, Cystein (2%) als Aminosäure, Glucose (5%), Thymol (5%), modifizierte Gelatine (5%) und Kochsalz (0,9%) keinen deutlichen Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit von 4000×10^{-6} M BPL. Na-Azid (2%) hemmt stark.

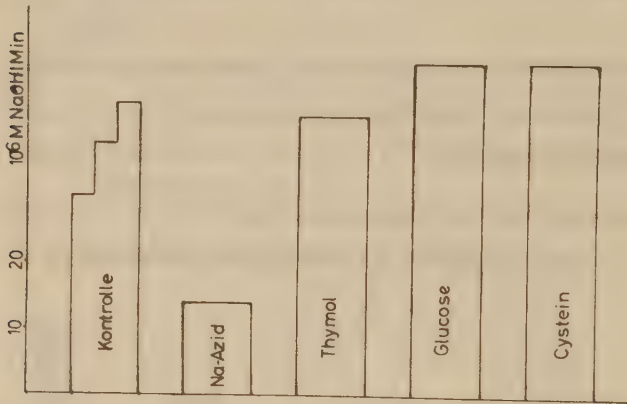


Abb. 7: Ansatz : 4000×10^{-6} M BPL bei 32°C, pH 7, Gesamtvolumen 11,25 ml

Kontrolle: H₂O
Na-Azid : 2%
Thymol : 8%
Glucose : 5%
Cystein : 2%

II. Teil: BPL-Hydrolyse in frischem Humanserum

Frishes Humanserum hydrolysiert BPL rascher als Wasser bei gleicher Temperatur und gleichem pH, gemessen an den freigesetzten Protonen pro Zeit (Abb. 1).

Die Hydrolysegeschwindigkeiten im Wasser und Serum wurden jeweils verglichen und die Differenz zwischen Serumhydrolyse V_S und Spontanhydrolyse V_{H_2O} berechnet. Später ergab sich, daß als Vergleichswert inaktives Serum anstelle des Wassers angemessener gewesen wäre. Da aber zwischen Wasser und inaktivem Serum keine Differenz gefunden wurde, wurden diese Versuche nicht nachgeholt.

Die Hydrolysegeschwindigkeit im Serum wurde in Abhängigkeit von pH, Temperatur, BPL-Konzentration und Serumkonzentration geprüft.

1. Abhängigkeit vom pH (Abb. 8)

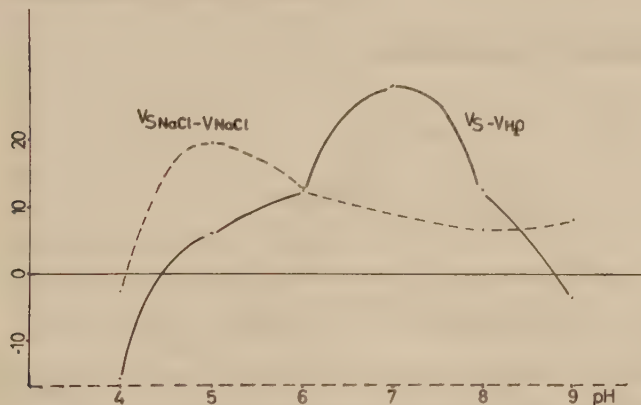


Abb. 8: Differenz der BPL-Hydrolyse in Wasser mit und ohne Serum und in physiologischer Kochsalzlösung mit und ohne Serum. $20\ 000 \times 10^{-6}$ M BPL bei 20°C , Gesamtvolumen 16,25 ml

Die Differenz ist am größten bei pH 7 und sinkt sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich ab. Über pH 9 und unter pH 4,5 wird der Wert negativ. Die beschleunigende Substanz entfaltet also ihre Aktivität im physiologischen pH-Bereich am besten. Sie ist nur in den engen pH-Bereichen von pH 5 - pH 8 wirksam. Daß die Differenz unter pH 4,5 und über pH 9 negativ wird, die Spontanhydrolyse also schneller verläuft als die Serumhydrolyse, sehen wir als Hinweis dafür, daß BPL neben der Hydrolyse noch auf andere Weise ohne Freisetzung von Protonen reagiert. Die Art der Reaktion haben wir durch verschiedene Versuche näher analysiert.

Die Differenz $V_{\text{Serum in NaCl}} - V_{\text{NaCl}}$ (NaCl Hydrolyse in 0,9% wäßriger NaCl-Lösung) ergab ein pH-Optimum bei pH 5. Diese Abweichung zwischen maximaler Differenz $V_{\text{Serum}} - V_{\text{H}_2\text{O}}$ gegen $V_{\text{Serum}} - V_{\text{NaCl}}$ wurde nicht näher analysiert.

2. Abhängigkeit von der Temperatur

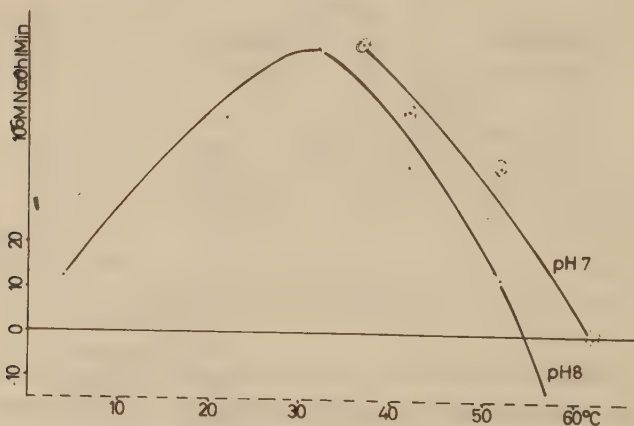


Abb. 9: Spontan- und Serumhydrolyse von BPL in Abhängigkeit von der Temperatur. $2000 \times 10^{-6} \text{ M}$ BPL, pH 8... pH 7 oo. Gesamtvolumen 15,125 ml.

Die Werte der Ordinate geben die Differenz zwischen Serum- und Wasserhydrolyse an.

Die BPL-Hydrolyse durch Serum steigt mit zunehmender Temperatur linear an, über 32°C jedoch langsamer als die entsprechende Zunahme der Spontanhydrolyse. Daher ist die Serumhydrolyse der Spontanhydrolyse bei 32°C am stärksten überlegen. Über 55°C ist Serum inaktiv.

Da bei 62°C und pH 8 die Spontanhydrolyse die Serumhydrolyse übersteigt, ist wie oben erwähnt an eine Nebenreaktion zwischen BPL und denaturiertem Serumprotein ohne Protonenfreisetzung zu denken.

3. Abhängigkeit von der BPL-Konzentration

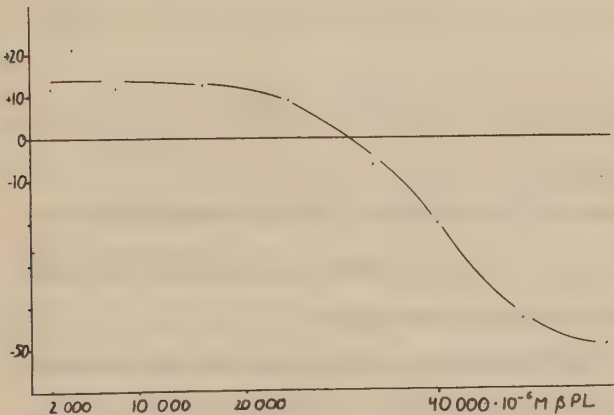


Abb. 10: Differenz zwischen der BPL-Serumhydrolyse und der BPL-Spontanhydrolyse in Abhängigkeit von der BPL-Konzentration bei 20°C , pH 8, Gesamtvolumen 15 - 18,5 ml

Der Serumeffekt ist nur bei geringer BPL-Konzentration ($2000 - 4000 \times 10^{-6}\text{ M}$) eindeutig erkennbar. Die Differenz $V_{\text{Serum}} - V_{\text{H}_2\text{O}}$ wird über $28\,000 \times 10^{-6}\text{ M}$ BPL negativ. Bei hoher BPL-Konzentration

reagiert offenbar ein gewisser Anteil mit dem Serumweiß ohne Freisetzung von Protonen. Daher ist in Gegenwart von Serum die pro Zeiteinheit freigesetzte Protonenmenge geringer als in Wasser allein.

4. Abhängigkeit von der Serumkonzentration

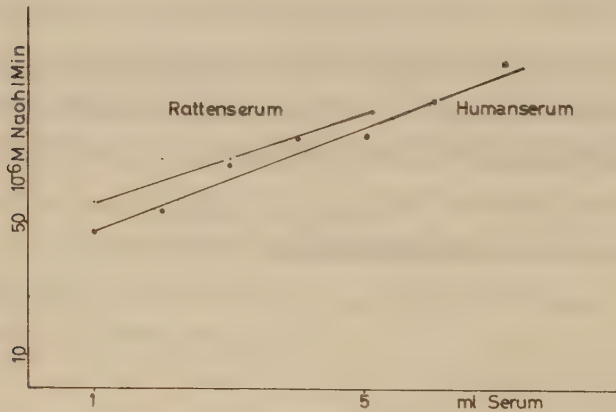


Abb. 11: BPL-Hydrolyse in Ratten- und Humanserum

$20000 \times 10^{-6} \text{ M BPL}$ bei 20°C , pH 8, Gesamtvolumen 15 ml

Die Abbildung zeigt, daß die Hydrolysegeschwindigkeit mit steigender Serumkonzentration linear zunimmt.

Temperatur- und pH-Abhängigkeit sowie Abhängigkeit von der Serumkonzentration und Hemmung durch zu hohe Substratkonzentrationen sprechen dafür, daß die raschere β Propiolakton-Hydrolyse im Serum durch ein Enzym bedingt wird. Wenn es sich dabei um ein Enzym handelt, sollte sich dieses durch Erhitzen und durch Belastung bei extremen pH inaktivieren lassen. Außerdem ist damit zu rechnen, daß das Enzym bei Lagerung an Aktivität einbüßt.

Die entsprechenden Versuche zeigten folgende Ergebnisse:

5. pH Stabilität der hydrolysierenden Substanz

2 ml Humanserum wurden bei Zimmertemperatur jeweils 15 Minuten lang bei dem angegebenen pH gehalten und anschließend bei pH 7 die Hydrolyse gemessen.

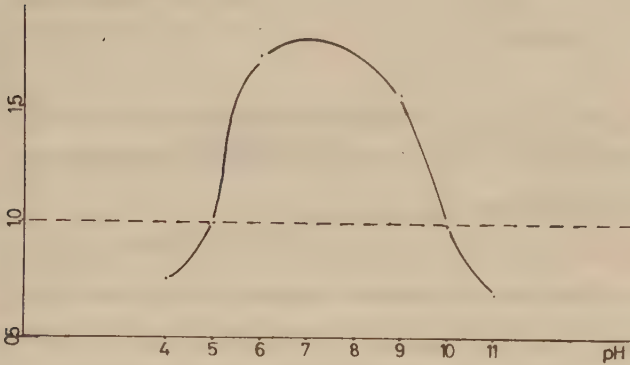


Abb. 12: 4000×10^{-6} M BPL bei 20°C , pH 7, Gesamtvolumen 15 ml,
2 ml Humanserum

Die Werte der Ordinate geben das Verhältnis der Serumhydrolyse zur Spontanhydrolyse an ($V_{\text{Serum}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$).

Unter pH 5 oder über pH 10 gelagertes Serum zeigt keine Hydrolysenaktivität mehr. Im Gegenteil, es hemmt die Protonenfreisetzung verglichen mit H_2O . Offenbar wird ein Teil des BPL für eine Reaktion verbraucht, bei der keine Protonen frei werden.

6. Lagerungsstabilität der hydrolysierenden Substanz

Tabelle 1: lagert man die hydrolysierende Substanz bei pH 7 und 37°C für drei Tage, verliert sie die Aktivität.

3 Tage aufbewahrtes Serumkonzentrat ^o	Aktivität ⁺
eingefroren	19 x 10 ⁻⁶ M NaOH/Min
20°C	22 x 10 ⁻⁶ M NaOH/Min
37°C	11 x 10 ⁻⁶ M NaOH/Min
Kontrolle H ₂ O	11 x 10 ⁻⁶ M NaOH/Min

Wenn ein Enzym für die β -Propiolakton-Hydrolysenaktivität des Serums verantwortlich ist, sollte es durch Fraktionierung angereichert werden können.

Euglobulinfällung und Acetonfraktionierung führten zur Inaktivierung im Überstand und Sediment. Dagegen war nach Adsorption von Serum an SiO₂ der Überstand inaktiv, während das in Wasser aufgeschwemmte SiO₂ starke Aktivität zeigte. Aus diesem SiO₂ läßt sich das aktive Enzym durch wäßrige Salzlösungen hoher Ionenkonzentration extrahieren.

7. Anreicherung

Wir stellten uns Konzentrate der hydrolysierenden Substanz nach folgendem Verfahren her: 30 g mit Serum behandeltes SiO₂ wurden mit physiologischer Kochsalzlösung eiweißfrei gewaschen und in 50 ml 12,5% NaCl-Lösung suspensiert und mit 1-N NaOH auf pH 9 eingestellt.

Nach 60 Minuten Rühren bei Zimmertemperatur wird 20 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird auf pH 7,5 gebracht und 16 Stunden gegen 0,9% NaCl-Lösung dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

^o aus Serum an SiO₂ adsorbierte hydrolysierende Substanz. Herstellung siehe unten.

⁺Ansatz: 5 ml SiO₂ Niederschlag, 4000 x 10⁻⁶ M β PL, pH 7, Gesamtvol. 15 ml.

III. Teil: Konkurrenz zwischen GPL-Hydrolyse und Azylierung

Verglichen mit der GPL-Hydrolyse in Wasser erfolgt die Protonenfreisetzung im Serum zwar rascher, aber gleichzeitig ist ein Defizit an Protonenausbeute festzustellen. Dieses Defizit ist auch bei inaktivem Serum vorhanden, hier sogar noch höher als bei aktivem.

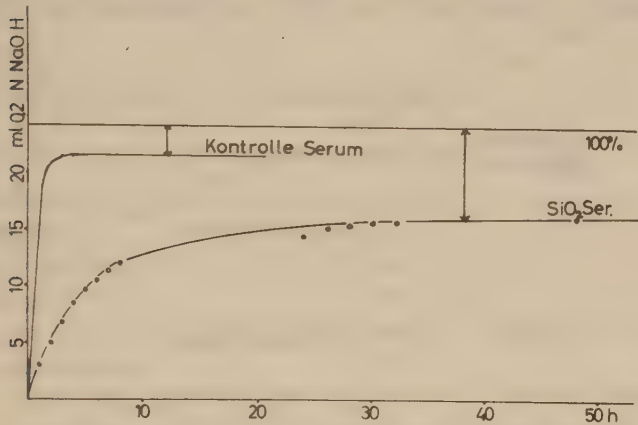


Abb. 13: Protonenfreisetzung (verbrauchte Menge NaOH) bei Hydrolyse von GPL im aktiven und inaktiven (SiO_2 behandelten) Serum, verglichen mit der Protonenausbeute bei Hydrolyse in H_2O

Möglicherweise kommt dieses Defizit dadurch zustande, daß ein Teil des GPL das Serumprotein azyliert. Der für die Azylierung verbrauchte Anteil fehlt bei der Titration von Protonen (s. Formel 1). In diesem Fall sollte die Ausbeute an Protonen proportional der Menge azylierbaren Proteins abnehmen. Das zeigen die folgenden Versuche: Dabei wurden jeweils 1500×10^{-6} M GPL mit einer wäßrigen Eiweißlösung (0 - 1,5 g pro 10 ml) bei Zimmertemperatur 7 Tage stehen gelassen, um eine vollständige Zersetzung von GPL zu erreichen.

Während dieser Zeit reagiert GPL sowohl mit den azylierbaren Gruppen des Proteins als auch mit Wasser. Anschließend wurde mit NaOH auf pH 7,0 titriert. Die verbrauchte Lauge zeigt an, wieviel Protonen freigesetzt wurden.

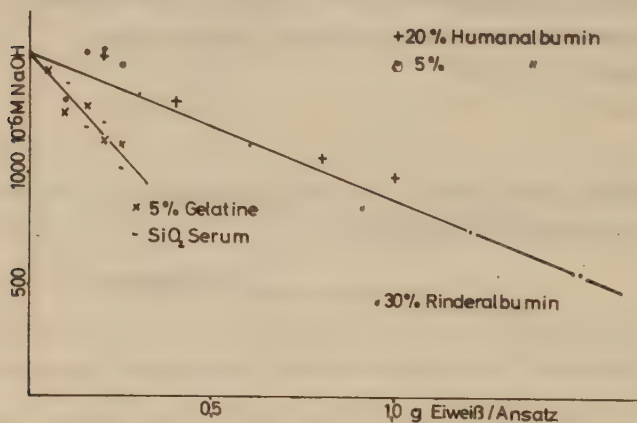


Abb. 14: Abhängigkeit der freigesetzten Protonenmenge nach vollständiger Hydrolyse von 1500×10^{-6} M GPL von der Menge zugesetztem Eiweiß. 20°C, Titration auf pH 7, Gesamtvolumen 10 ml

Der azylierende Anteil des GPL steigt erwartungsgemäß mit zunehmender Eiweißkonzentration. Er ist bei Gelatine und inaktivem Humanserum (SiO_2 Serum) größer als bei den Albuminen.

Daraus ergibt sich die Frage, welche Gruppen des Proteins für die Azylierung durch GPL verantwortlich sind. Es kann angenommen werden, daß es einmal die freien Aminogruppen sind, zum andern freie SH-Gruppen. Außerdem könnten auch noch die Guanidiningruppen und Carboxylgruppen reagieren.

Daher wurden Cystein und Thiosulfat als SH-Gruppensubstanzen geprüft, als Aminosäuren Glykokoll, Glutaminsäure und Lysin, das Guanidin-

gruppenreiche Protamin und als Karboxylgruppendonator Caprylsäure.

Sowohl die SH- als auch die Amino- und die Karboxylgruppe lassen sich durch BPL azylieren, nicht dagegen die Guanidgruppe im Protamin.

Titration von 1500×10^{-6} M BPL, das mit 1500×10^{-6} der unten aufgeführten Substanzen eine Woche bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde.

Tabelle 2:

Titration bis pH 7, 20°C , Gesamtvolumen 10 ml

Substanz	verbrauchte Menge NaOH (10^{-6} M)
Thiosulfat	620
Caprylat	777
Glutaminsäure	1 050
Lysin	1 363
Glykokoll	1 604
Protaminsulfat	2 111

In wäßriger Lösung der geprüften Substanzen läuft daneben aber auch als Konkurrenzreaktion die Hydrolyse durch Wasser ab.

Die Protonenfreisetzung aus BPL ist am geringsten in Gegenwart von Thiosulfat, dann folgt Caprylat, dann Glutaminsäure, Lysin. Die Hydrolysenreaktion bleibt in Gegenwart von Glykokoll am besten erhalten.

IV. Teil: Inaktivierung des Enzyms durch BPL

Genauso wie die anderen Proteine durch BPL azyliert werden, muß damit gerechnet werden, daß auch das Enzymprotein durch BPL azyliert wird. Dadurch könnte das Enzym inaktiviert werden. Es müßte dann eine Konkurrenzreaktion zwischen der Substratspaltung und der Reaktion zwischen Enzymprotein und Substrat zu inaktivem Enzym beobachtet werden können. Die folgenden Versuche zeigen, daß diese Annahme zutrifft. Während das Enzym die Hydrolyse von BPL katalysiert, verliert es an Aktivität und kann, noch bevor die Hydrolyse zu Ende verlaufen ist, inaktiv geworden sein. Das heißt, die Hydrolyse verläuft nach Inaktivierung des Enzyms mit der Spontangeschwindigkeit weiter, die die Hydrolyse in Wasser bei gegebenem pH besitzt (Abb. 15).

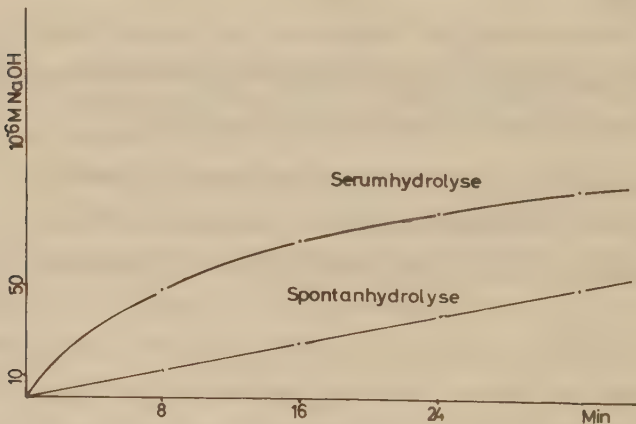


Abb. 15: Spontan- und Serumhydrolyse von 2500×10^{-6} M BPL bei 20°C , pH 7, Gesamtvolumen 15 ml, 5 ml Serum

Die Inaktivierung durch GPL läßt sich auch dadurch zeigen, daß man Enzym mit GPL stehen läßt und nach Abdialyse des GPL das Enzym auf seine Aktivität prüft. Zur völligen Inaktivierung von 2,5 ml konzentrierter Hydrolasenaktivität (Eluat aus SiO_2 Adsorbat) bei 20°C in zwei Stunden reichen 1000×10^{-6} M GPL aus. Um zu verhindern, daß das Enzym bei diesen Versuchen durch das saure Milieu des Hydrolysenproduktes β -Hydroxypropionsäure denaturiert wird, wurde das Enzym mit dem GPL in Gegenwart von Na-Boratpuffer pH 7,8 inkubiert.

Höhere GPL-Konzentrationen inaktivieren sehr viel rascher. Mit 4000×10^{-6} M GPL bei pH 7 und 20°C reichen bereits 15 Minuten, um das Enzym völlig zu inaktivieren.

V. Teil: Zur Kinetik der BPL-Hydrolyse

Die Hydrolyse von BPL in neutralem und leicht saurem Milieu verläuft mindestens zu Anfang als Reaktion erster Ordnung, da die Geschwindigkeit der Reaktion in gleichem Maß abnimmt wie die BPL-Konzentration entsprechend der Gleichung

$$-\frac{dc}{dt} = k \times c$$

bzw.

$$k \times t = 2,3 \times \lg \frac{c_0}{c}$$

Verfolgt man die BPL-Konzentration im Verlauf der Hydrolyse und trägt den Logarithmus der zu jedem Zeitpunkt noch vorhandenen BPL-Menge gegen die Zeit auf, erhält man eine Gerade.

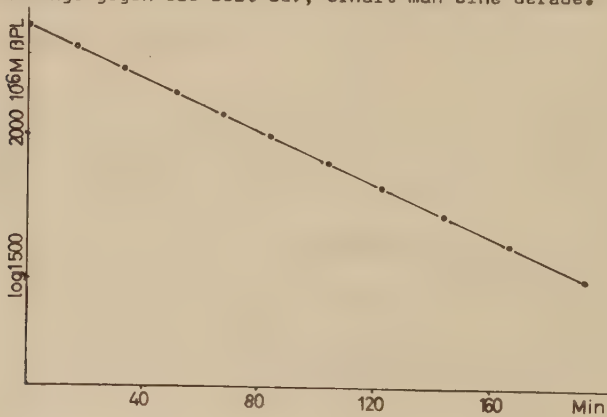


Abb. 16: Hydrolyse von 2500×10^{-6} bei 20°C und pH 7 in 15 ml Wasser, logarithmische Darstellung

Folgende Versuchsanordnung sollte zeigen, ob das Reaktionsprodukt β -Hydroxypropionsäure den Ablauf der Hydrolyse beeinflusst. Während des ganzen Versuches wurde die BPL-Konzentration konstant gehalten, indem der hydrolysierte Anteil jeweils durch neu zugesetztes BPL auf die Ausgangsmenge ergänzt wurde. Damit stieg das Produkt β -Hydroxypropionsäure laufend an bei konstanter Substratmenge. Mit dieser Anordnung wurde die Spontanhydrolyse in H_2O , die Serumhydrolyse und die Hydrolyse durch Schweineleberesterase gemessen:

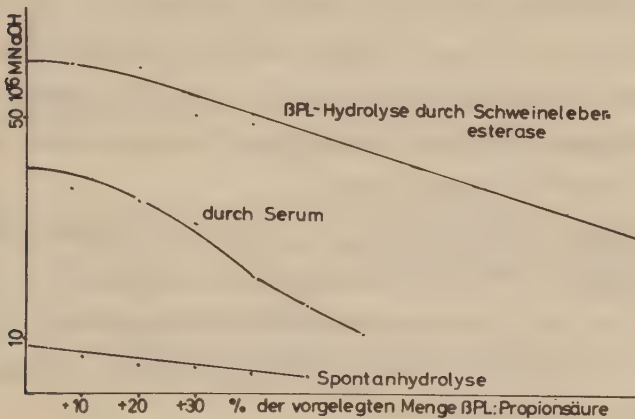


Abb. 17: Hydrolyse von 2500×10^{-6} M BPL durch Schweineleberesterase, Serum und in Wasser. 20°C , pH 7, Gesamtvolumen 15 ml. Die Ordinatenwerte geben die Geschwindigkeit der Reaktion an, die Werte der Abszisse die im Ansatz enthaltene β OH-Propionsäure in % der vorgelegten Menge BPL.

Jede dieser Reaktionen verläuft mit steigender Menge β -Hydroxypropionsäure langsamer, d.h. sie wird durch diese gehemmt. Der unverhältnismäßig steile Abfall der beiden enzymatischen Reaktionen im Vergleich mit der Hydrolyse in Wasser dürfte auf die gleichzeitige Azylierung der Proteine und damit auf deren Inaktivierung zurückzuführen sein. Sie

ist bei der Serumhydrolyse ausgeprägter als bei der Schweineleber-esterase.

Die Enzymnatur der β PL-Hydrolyse ergab sich auch aus folgendem Versuch: Eine wäßrige Lösung von β PL hydrolysiert bis zu einem Gleichgewicht: β PL $\rightarrow$ β -Hydroxypropionsäure + H^+ . Vergrößert man anschließend die Konzentration von β PL oder Wasser oder setzt man einen Partner zu, der anstelle von H_2O mit β PL unter Freisetzung von Protonen reagiert, müßten erneut Protonen titrierbar sein. Das war auch tatsächlich bei der Zugabe von β PL der Fall. Nach Zugabe von Serum dagegen wurde keinerlei Reaktion registriert, ebenso wenig nach Schweineleberesterase. Dies erhärtet die Annahme, daß die Freisetzung der Protonen nicht aus einer stöchiometrischen Reaktion zwischen β PL und Serum stammt.

Für die Reaktion Enzym + β PL und H_2O + β PL wurden Lineweaver-Burk-Kurven errechnet. Da die Inaktivierung der Hydrolyse durch β PL eine möglichst geringe Rolle spielen sollte, berücksichtigten wir lediglich die Hydrolysegeschwindigkeit im Beginn eines jeden Ansatzes. Es ergaben sich folgende Kurven:

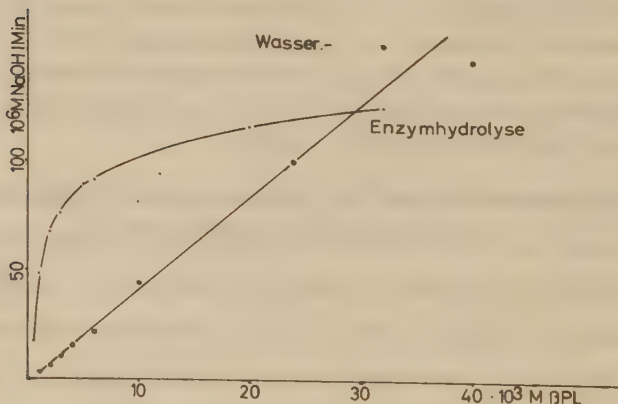


Abb. 18: Hydrolysegeschwindigkeit in Wasser und Serum mit steigender β PL-Konzentration. $20^\circ C$, pH 8, Gesamtvolumen 15 ml, 5 ml dialysiertes Enzym

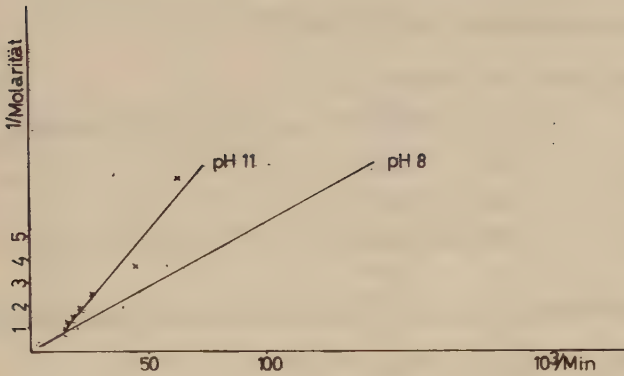


Abb. 19: Lineweaver-Burk-Kurve der Enzymhydrolyse

Für $V_{\max}$ - die Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung - errechnet sich $144 \times 10^{-6} \text{ M BPL/Min}$, da $1/V_{\max} = 7 \times 10^3 \text{ Min/Mol}$.

Die Steigung $K_m/V_{\max} = 5/9$. K_m ist dadurch mit $80 \times 10^{-6} \text{ M/Min}$ berechnet.

VI. Teil: Zur Biologie des Enzyms

1. Vorkommen bei verschiedenen Spezies

Es wurden verschiedene Tiersera geprüft:

Tabelle 3: (2000 x 10⁻⁶ M BPL, 20°C)

Spezies	pH	Aktualität $V_{\text{Serum}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$ 10 ⁻⁶ M NaOH/Min
Mensch	8	4,2
Schwein	8	8,3
Kaninchen	8	8,0
Ratte	7	3,5
Meerschweinchen	8	4,65
Maus	7	2,2
Rind	8	1,0

Die Tiersera sind also unterschiedlich aktiv, Rinderserum hydrolysiert genauso rasch wie Wasser auch. Nach SiO₂ Behandlung zeigt weder das SiO₂ Adsorbat noch der Überstand Aktivität. Es enthält also kein Enzym, dessen Wirkung durch die gleichzeitige Anwesenheit eines Hemmstoffes hätte kompensiert sein können (Tab.5).

2. Vorkommen in verschiedenen Organen

Es wurden Rattenorgane untersucht. Nach Homogenisieren in physiologischer Kochsalzlösung (4 ml/1 g Organ) wurde zentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes zur Aktivitätsprüfung eingesetzt.

Ansatz: Gesamtvolumen 2,5 ml, BPL 0,02 ml.

Organanteil 0,5 ml = 0,125 g Organfrischgewicht,

pH 7; 20°C

Ergebnis:

Tabelle 4:

Organ	10^{-6} M NaOH/Min
-	1,0
Niere	1,0
Herz	1,0
Milz	1,0
Lunge	1,0
Leber	2,5

Als einziges Organ ist die Leber hydrolaseaktiv.

Tabelle 5 Gesamtvolumen 15 ml, 20°C , pH 8, 4000×10^{-6} M GPL

Hydrolysengeschwindigkeit 10^{-6} M NaOH/Min

Wasser	9
Rinderserum	8
SiO_2 Nd	9
Überstand	7
1. Waschflüssigkeit	7,5
2. Waschflüssigkeit	7,5

3. Beeinflussung der Enzymaktivität in vivo

Es ist bekannt, daß die Lipoproteidlipase durch Fettbelastung und Heparinungen oder deren Analoga aktiviert werden kann. Es wurde daher geprüft, ob die GPL-Hydrolase ebenso beeinflusst werden kann.

Nach Blutentnahme (Probe 0) aß die Versuchsperson ein Stück Sahnekuchen (100g Fett) und trank einen Viertel Liter Sahne. Nach 1,5 h Blutentnahme (Probe 2) und 100 mg SP_{54} i.m., nach einer weiteren Stunde Blutentnahme (Probe 3).

Tabelle 6: GPL-Hydrolaseaktivität des Serums nach Fettbelastung und Gabe von SP_{54}
(Gesamtvolumen 15 ml; $20^{\circ}C$, pH 7, 4000×10^{-6} M GPL)

	Aktivität 10^{-6} M NaOH/Min
Wasser (Kontrolle)	9
Serum 0 (Ohne Fettbelastung)	25,0
Serum 1 (90' nach Fettbelastung)	24
Serum 2 (60' nach SP_{54})	24

Ergebnis: Weder durch Fettbelastung noch durch Gabe des Heparin-analogen SP_{54} konnte eine Aktivitätsänderung beobachtet werden.

4. Individuelle Verteilung der Enzymaktivität

Es wurde festgestellt, daß die Enzymaktivität bei gesunden Probanden unterschiedlich ist und daher versucht, eine Relation zwischen Alter, Blutgruppen, Geschlecht und Körpergewicht herzustellen. Eine Korrelation wurde nur zu dem Alter gefunden, bei jüngeren Menschen werden häufig höhere Aktivitäten gefunden.

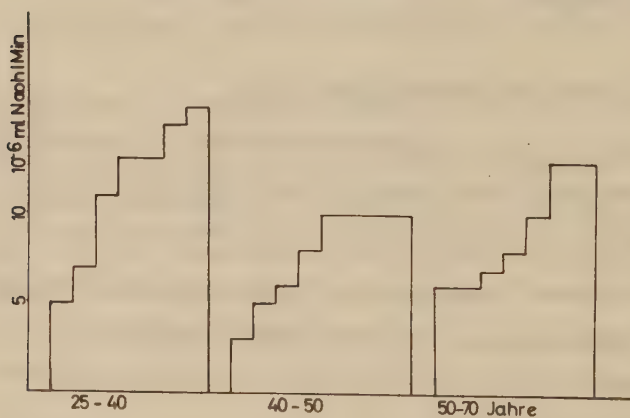


Abb. 2a: Serumhydrolaseaktivität, geordnet nach Altersgruppen
 4000×10^{-6} M GPL, $20^{\circ}C$, pH 7, Gesamtvolumen 15 ml

VII. Teil: Substratspezifität

Es ist anzunehmen, daß das Enzym, das die β PL-Hydrolyse aktiviert, eine unspezifische Hydrolase ist und daher auch andere hydrolytische Reaktionen katalysiert. Es wurden daher eine Reihe von Substanzen geprüft:

Die Ester Buttersäuremethyl- und äthylester, Tween 40,

die Aminoazylverbindung Acetylcholin

die Lactone Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, Glucuronsäure-

und Gluconsäurelaktone.

Tabelle 7:

Substrat	Menge 10^{-6} M	pH	Ges. Vol. ml	Spontanhydr. 10^{-6} M NaOH/Min	Enzym	H. Geschw.
Buttersäure-methylester	4000	7	15	o	2,5 ml Eluat	o
Buttersäure-äthylester	4000	7	15	o	2,5 ml Eluat	o
Tween	8 ml	7	10	o	5 ml SiO_2 Nd	0,001
Acetylcholin	4000, 32°C	7	10	o	5 ml Serum	18
Ascorbinsäure	4000	7	15	o	5 ml Serum	o
Dehydroascorbinsäure	4000	7	15	o	5 ml Serum	o
Glucuronsäure-lakton	4000	7	15	7	5 ml SiO_2 Nd	37

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß unter den Versuchsbedingungen von den geprüften Substraten nur Glucuronsäurelaktone spontan hydrolysiert. Durch Serum wird die Hydrolyse von Glucuronsäurelaktone beschleunigt und Acetylcholin gespalten. In beiden Fällen verläuft die Hydrolyse im Gesamtserum schneller als die Hydrolyse des Konzentrats

durch SiO_2 Adsorption. Da in diesem Konzentrat die BPL-Hydrolase angereichert ist, dürfte für die beobachtete Acetylcholin- und Glucuronsäurelactonspaltung nicht die BPL-Hydrolase verantwortlich sein.

1. Konkurrenz BPL - Glucuronsäurelacton

Es wurden Versuche durchgeführt, um die gegenseitige Beeinflussung des BPL und Glucuronsäurelactons zu beobachten.

Tabelle C:

BPL 10^{-6} M	Glucuronsäurelacton	pH	$^{\circ}\text{C}$	Vol.	Geschwindigkeit $10^{-6} \text{ M NaOH/Min}$
2000		8		15 ml	12,5
4000					23
6000					44
	2000				9
	4000				19
	6000				21
2000	2000				30
4000	4000				87
6000	6000				100

Die gleichzeitige Hydrolyse von BPL und Glucuronsäurelacton in Wasser ergibt höhere Werte, als es die Summe der Einzelhydrolyse erwarten ließe. - Vielleicht bildet sich eine BPL-Glucuronsäureverbindung, die sehr schnell Protonen freisetzt?

Tabelle 9:

BPL	Gluc.srel.	Eluat	pH	Vol	Geschwindigkeit
	2000	2,5 ml	8	15 ml	100
2000	2000	"	"	"	94
	4000	"	"	"	125
4000	4000	"	"	"	125
	6000	"	"	"	225
6000	6000	"	"	"	212

Die Hydrolysegeschwindigkeit des Glucuronsäurelactons mit Eluat wird durch gleiche Mengen BPL nicht beschleunigt.

Schließlich hat uns interessiert, ob bekannte Enzyme die BPL-Hydrolyse in Wasser beeinflussen.

Tabelle 10:

Enzym	BPL $10^{-6} M$	$^{\circ}C$	pH	Hydrolysegeschwindigkeit $10^{-6} M NaOH$
-	2000	20	8	9
3 mg Schweineleber- esterase*	2000	20	8	18
0,1 mg Hydrolasengemisch aus Aspergillus Orizae	2000	20	8	6
0,5 mg "	2000	20	8	0
-	4000	20	7	12
5 mg Thrombin	4000	20	7	12
5 mg Trypsin	4000	20	7	9
" + Trypsininhibitor	4000	20	7	8
5 mg Pepsin	4000	20	7	9
6 mg Lysozym	4000	20	7	6
3 mg β -Galaktosidase	4000	20	7	12
7,5 mg Chymotrypsin	4000	20	7	12

* Das Enzympräparat wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. med. K. Krisch (Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Enzym	BPL 10^{-6} M	°C	pH	Hydrolisengeschwindigkeit 10^{-6} M NaOH
Makroglobulin-trockenplasma	4000	20	7	11
Hämophilie "	4000	20	7	12
8 mg Pyridoxalphosphat	4000	20	7	12
2 ml Humanserum	4000	20	7	27,5
" + 5 mg Pyridoxalphosphat	4000	20	7	27,5
" + 7 mg Pyridoxamindihydrochlorid	4000	20	7	30
6,5 mg Pronase	4000	20	7	16

Lediglich die Schweineleberesterase beschleunigt deutlich. Das

Hydrolasengemisch aus *Aspergillus Orizae* (Boehringer) hemmt.

In Gegenwart von Trypsin, Pepsin und Lysozym verläuft die Hydrolyse etwas langsamer, möglicherweise durch die konkurrierende Azylierung dieser Enzymproteine durch BPL.

3. In Gegenwart verschiedener in Wasser gelöster Stoffe kann die Protonenabgabe geändert werden, entweder dadurch, daß die Hydrolyse mit Wasser katalysiert wird oder die gelösten Stoffe selbst mit GPL reagieren.

Beispiel: NaCl



4. GPL kann azylieren, indem es mit reaktionsfreudigen Gruppen so reagiert, daß die Carbonylgruppe an den Reaktionspartner gebunden wird. Dabei treten keine Protonen auf. Die Azylierungsreaktion kann z.B. mit Aminogruppen, Sulfhydrylgruppen und Hydroxylgruppen erfolgen.

5. GPL kann alkylieren, indem es mit reaktionsfähigen Gruppen so reagiert, daß die Hydroxylgruppe an den Reaktionspartner gebunden wird. Dabei treten Protonen auf.

In Gegenwart von Serum wurde eine beschleunigte Hydrolyse beobachtet. D.h. pro Zeit werden mehr Protonen abgegeben, und daneben besteht eine herabgesetzte Protonenausbeute pro eingesetztem Mol GPL. Die Analyse hat gezeigt, daß die beschleunigte Hydrolyse an eine Serumkomponente gebunden ist, die sich wie ein Enzym verhält, und daß die verminderte Protonenausbeute durch eine Reaktion zwischen GPL und Protein zustande kommt. Diese Reaktion, bei der keine Protonen freigesetzt werden, konkurriert mit der Hydrolyse.

Durch alle Maßnahmen zur Inaktivierung verschwindet im Serum die erhöhte Hydrolasegeschwindigkeit, dagegen bleibt die verminderte Protonenausbeute erhalten.

BPL reagiert offenbar mit geeigneten reaktiven Gruppen aller Proteine, also auch mit Enzymproteinen. Durch BPL-Modifikation des Proteinmoleküls können Enzyme inaktiviert werden. So wird auch die für die Katalyse der Reaktion BPL + Wasser verantwortliche Serumhydrolase durch BPL modifiziert und dabei inaktiviert. Daher sind alle Aktivitätsmessungen dieses Enzyms bei Einsatz von BPL als Substrat gestört durch die gleichzeitig verlaufende Inaktivierungsreaktion.

Welches das natürliche Substrat der BPL-Hydrolase ist, konnte noch nicht ermittelt werden. Ester oder Peptide werden nicht gespalten, auch die Spaltung anderer Laktone scheinen vom Enzym nicht katalysiert zu werden. Weder aus der Substratspezifität noch aus dem sonstigen Verhalten konnte die BPL-Hydrolase mit einem bereits bekannten Serumenzym identifiziert werden.

Tabelle⁺ der bisher im Serum nachgewiesenen hydrolytischen Enzyme:

Acetylcholinesterase	Acetylcholin
Saure Phosphatase	Monoester der Orthophosphorsäure
Ali-Esterase	Ester
Alkalische Phosphatase	Phosphomonoester
Amylase	Stärke
β -Glucuronidase	β -Glucuronidbindungen
Leucinaminopeptidase	1-Leucin-Peptidbindungen
Lipase	Triglyceride
Tropinesterase	Atropinsulfat

Welche Rolle das Enzym im Serum spielt, ist somit noch nicht bekannt.

Auffällig sind die unterschiedlichen Aktivitäten bei einer gesunden Population. Ob Beziehungen zu bestimmten Krankheitszuständen bestehen, muß noch geprüft werden. Unter den bisher geprüften Organen fanden wir nur in der Leber Enzymaktivität. Der Synthesort für das Serumenzym ist möglicherweise die Leber.

⁺ Putnam: The Plasma Proteins, Volume II, S. 62-67

Z U S A M M E N F A S S U N G

β -Propiolakton wird durch Wasser spontan hydrolysiert. Die Hydrolysegeschwindigkeit richtet sich nach Temperatur, pH und BPL-Konzentration.

In Gegenwart von Serum ist die Hydrolyse rascher, und zwar proportional der zugesetzten Serummenge. Die maximale Differenz $V_{\text{Serum}} - V_{\text{Wasser}}$ liegt bei pH 7, 32°C und kleinen Mengen BPL (bis ca $16\,000 \times 10^{-6}$ M).

Ansäuerung auf pH 5 und alkalisieren über pH 10 inaktiviert das Serum. Die Aktivität verschwindet nach Lagerung bei 37°C für 3 Tage.

Konkurrierend zur Hydrolyse reagiert BPL mit Proteinen unter Azylierung. Durch diese Azylierung wird die Hydrolase inaktiviert.

Als Modell für die Azylierung wurden Reaktionen zwischen BPL und Thiosulfat, Glykokoll, Lysin, Glutaminsäure und Caprylat untersucht.

Außer im Serum wurde das Enzym bisher nur in der Leber nachgewiesen. Die β -Propiolaktonhydrolase befindet sich im Serum von Mensch, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen, Maus und Ratte, nicht dagegen beim Rind.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. FROST-PEARSON

Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen

2. LONG, F.A., PURCHASE, MARY

The Kinetics of Hydrolysis of β -Propiolactone in Acid,
Neutral and Basic Solutions.

Journal American Chemical Society July 1950

3. PANVELIWALIA, D.K., MOSS, D.W.

A Comparison of Aminoacyl- β -Naphthylamide Hydrolases in
Extracts of Human Tissues.

Biochemical Journal (1966) 99, 501

4. PILZ, W.

Untersuchungen über Fermente des menschlichen Blutes.

Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin 131,
346 - 352 (1952)

5. PUTNAM, FRANK W.

The Plasma Proteins, Academic Press 1960

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, besonders Herrn Professor Dr. L. Róka für die Geduld und das Verständnis, das er stets aufbrachte.

Herrn Dr. Schleusner, dem Leiter des BIOTEST-Seruminstitutes, möchte ich dafür danken, daß ich die Arbeit in seinem Institut durchführen durfte und daß er alle dafür benötigten Mittel kostenlos zur Verfügung stellte.

Frau Degler danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

L E B E N S L A U F

Am 14.9.1942 wurde ich in Straßburg als ältestes Kind von Dr. med. Gerhard und Renate Rossow geboren.

Ich besuchte die Schule in Kadsruhe und Frankfurt bis zum Abitur 1962.

Die vorklinischen Semester studierte ich in Frankfurt, wo ich im März 1963 die naturwissenschaftliche und im Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Die ersten beiden klinischen Semester hörte ich in Hamburg. Im Februar 1968 bestand ich in Frankfurt das ärztliche Staatsexamen.

Meine chirurgische Pflichtzeit leistete ich vom 1.5.1968 bis zum 30.8.1968 im Krankenhaus in Quakenbrück ab. Ich bin seit dem 1.10.1968 Medizinalassistentin in der Medizinischen Klinik in Gießen.

EHRENWÜRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Gießen zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

" β -Propiolaktonhydrolyse in Wasser und Serum"

im BIOTEST-Seruminstitut in Frankfurt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Röka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Gießen, den 20. 4. 69

Günther Wessow

